

HÚSTERMELÉSRE HATÓ KÉT KANDIDÁNS GÉN POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ JUH GENOTIPUSOKBAN

JÁVOR ANDRÁS - KUSZA SZILVIA -
KŐSZEGI SÁNDOR - KUKOVICS SÁNDOR

ÖSSZEFOGLALÁS

A húshasznosítású juh fajták termelésének javítására szolgáló tenyésztési programok tervezésénél ma már szinte elengedhetetlen a termelési jellegek különbségeinek okát kutató genetikai vizsgálatok alkalmazása. Szerzők vizsgálataik során különböző juh genotípusok (tisztavérű gyimesi racka, gyimesi racka X beltex, gyimesi racka X brit tejelő juh, gyimesi racka X charollais, gyimesi racka X dorper, gyimesi racka X ile de france, gyimesi racka X német feketefejú, gyimesi racka X suffolk, gyimesi racka X texel) felhasználásával két hústermelésre ható gén (kalpastatin (CAST), inzulin-szerű növekedési faktor kötő fehérje-3 (IGFBP-3)) polimorfizmusát illetve annak hústermelési, vágási tulajdonságokra gyakorolt hatását állapították meg PCR-RFLP és PCR-SSCP módszerrel. Eredményeik igen alacsony szintű polimorfizmust mutattak a vizsgált génekkel, így további vizsgálatok szükségesek nagyobb elemszámmal, több keresztezéssel illetve több gén bevonásával.

SUMMARY

Jávor, A. – Kusza, Sz. – Kőszegi, S. – Kukovics, S.: POLYMORPHISM STUDY OF TWO CANDIDATE GENES EFFECT ON MEAT TRAITS IN DIFFERENT SHEEP GENOTYPES

Nowadays genetic study of different production traits is essential for the breeding programs. Authors studied the effect of polymorphism of two genes (calpastatine (CAST), insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)) on meat production using PCR-RFLP and PCR-SSCP methods in different sheep genotypes (pure bred Gyimesi Racka, Gyimesi Racka X Beltex, Gyimesi Racka X British Milkshope, Gyimesi Racka X Charollais, Gyimesi Racka X Dorper, Gyimesi Racka X Ile de France, Gyimesi Racka X German Black Head, Gyimesi Racka X Suffolk, Gyimesi Racka X Texel). Results for both genes showed very low level polymorphism therefore authors could not carry out association study between polymorphism and meat production traits. More studies are needed with more animals, more sheep genotypes and more genes.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Húshasznosítású állatok tenyésztésénél a cél a növekedési erély, a kedvező szaporodásbiológiai mutatók és az ellenálló képesség megőrzése mellett minél jobb minőségű és gazdaságos hústermelés. Ennek a folyamatnak a tudatos tervezéséhez ad jelentős segítséget az egyes termelési mutatók változásának tudományos vizsgálata, valamint a modern genetikai vizsgálatok által nyújtott információk. A növekedést befolyásoló gének azonosítását és tenyésztésben való hasznosítását célzó korábbi próbálkozások ismertek, azonban egyrészt az egyes gének hatása eltérő lehet a különböző fajták esetében, másrészt az elsődleges értékmerő tulajdonságokat, így a hústermelést is számos gén együttese határozza meg. Így feltétlenül hasznos volna minél több, a növekedést befolyásoló gén hatásának vizsgálata. Többek közt ilyen gén az általunk vizsgált kalpasztatin gén is. A kalpainok intercelluláris kalcium aktiválta proteinek egy fajtája, számos élettani és patológiai folyamatban fontos szerepet játszanak. Izomban a kalpain a miofibrillum fehérjék lebontásában játszik szerepet, és valószínű, hogy ez az elsődleges enzimrendszer, ami a halál utáni fehérjelebontásban részt vesz. Tulajdonképpen ez a biokémiai alapja a hús termelődésének (Zhou és mtsai, 2007). Ezenkívül a csökkent kalpain szint befolyásolja a szervezet Ca^{2+} homeosztázisát, olyan súlyos szöveti károsodásokat eredményezve, ami miokardiális infarktust, agyvérzést és egyéb agyi traumákat idézhet elő (Goll és mtsai, 2002). A kalpasztatin egy eddig egyetlen ismert endogén kalpain specifikus inhibitor, ami gátolja a kalpain aktivitást az elhalt szövetekben. Ezáltal az elhalás után a termelődés mértékét és nagyságát is szabályozza (Inazawa és mtsai, 1991). Egy önálló kalpasztatin génről a transzkripció és transzláció folyamán több 18-75 kDa tömegű kalpasztatin polipeptid is szintetizálódhat. Ennek hátterében az alternatív splicing jelensége áll, amikor is az egyik polipeptid szempontjából intronként viselkedő DNS-szakasz (vagy annak egy része) a másik polipeptidlánc számára kódoló szekvenciaként viselkedik és benne marad annak érett mRNS-ében (Goll és mtsai, 2002). A másik általunk vizsgált, hústermelésre ható gén az inzulin-szerű növekedési faktor kötő fehérje-3 (Insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3) egy strukturális gén, amely az inzulin-szerű növekedési faktorok rendszerében sokrétű hatásért felelős, emellett evolúciósan is fennmaradt. IGF-I és IGF-II hormonoknak mindezek mellett aktiváló szerepük van az emlőmirigy fejlődésében (Hossner és mtsai, 1997). Az IGF egy jelző rendszer, amely IGF-I-ből, IGF-II-ből, IGF-I receptorból, IGF-II receptorból és 6 kötő fehérjéből (IGFBP-1 - IGFBP-6) áll. Jelentős szerepet játszik a fejlődésben, növekedésben és szaporodásban, valamint az öregedésben (Bale és Conover, 1992; Hastie és mtsai, 2004, Duan és Xu, 2005). Az IGFBP-3 gén egy 264 aminosavból álló glikoprotein. Hastie és mtsai (2004) publikálták elsőnek ennek a génnek a cDNS szekvenciáját. Ez a publikáció az első, amely genomiális DNS-t használt juhok IGFBP-3 génjének nukleotid szekvenálásához. Ali és mtsai (2009) 4 egyiptomi juh fajtában vizsgálták a gén hústermelésben való jelentőségét. Sajnos nem találtak polimorfizmust, mindössze egy típusú restrikciós mintázatot találtak 5 különböző fragment hosszal. Kumar és mtsai (2004) azt találták, hogy a juh, szarvasmarha, bivaly fajok esetében IGFBP-3 gén szekvenciája 90%-ban azonos.

Jelen kutatásban az volt a célunk, hogy az általunk választott két gén polimorfizmus vizsgálatát elvégezzük 9 különböző juh genotípusban, és ha találunk polimorfizmust, vizsgáljuk annak hatását a hústermelési paraméterekre.

VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálati anyag

A Bakonszegi Awassi Zrt. tulajdonában állt fajtatiszta gyimesi racka állományt egy Jedlik Ányos program keretében nyolc más fajtaival kereszteztük (1.a, b táblázat) majd két gén polimorfizmusát meghatározva vizsgálni kívántuk annak a húsformák, hús kihozatali mutatókra gyakorolt hatását.

1.a táblázat

Egyedszámok a kalpastatin (CAST) gén polimorfizmus vizsgálata során

Keresztezés (1)	Vizsgált elemszám (2)	
	SSCP	RFLP
gyimesi racka (3)	15	15
gyimesi racka X beltex (4)	8	7
gyimesi racka X brit tejelő (5)	15	14
gyimesi racka X charollais (6)	9	9
gyimesi racka X dorper (7)	6	6
gyimesi racka X ile de france (8)	14	14
gyimesi racka X német feketefejú húsjuh (9)	5	5
gyimesi racka X suffolk (10)	11	11
gyimesi racka X texel (11)	21	20

Table 1a: Number of animals in polymorphism study of calpastatine (CAST) gene crossing (1); number of animals (2); Gyimesi Racka (3); Gyimesi Racka X Beltex (4); Gyimesi Racka X British Milkshoop (5); Gyimesi Racka X Charollais (6); Gyimesi Racka X Dorper (7); Gyimesi Racka X Ile de France (8); Gyimesi Racka X German Black Head (9); Gyimesi Racka X Suffolk (10); Gyimesi Racka X Texel (11)

1.b táblázat

Egyedszámok az IGFBP-3 gén polimorfizmus vizsgálata során

Keresztezés (1)	Vizsgált elemszám (2)	
	RFLP	
gyimesi racka (3)	15	
gyimesi racka X beltex (4)	8	
gyimesi racka X brit tejelő (5)	15	
gyimesi racka X charollais (6)	9	
gyimesi racka X dorper (7)	6	
gyimesi racka X ile de france (8)	14	
gyimesi racka X német feketefejú húsjuh (9)	5	
gyimesi racka X suffolk (10)	11	
gyimesi racka X texel (11)	21	

Table 1b: Number of animals in polymorphism study of IGFBP-3 gene (1)-(11) see Table1a

Vizsgálati módszer

A vizsgálatba vont egyedektől vérmintákat gyűjtöttünk és azokból *Zsolnai és Orbán* (1999) módszere alapján kivontuk a genomiális DNS-t, melyeket a további vizsgálatokig -20C-on fagyasztva tároltunk.

CAST gén polimorfizmus vizsgálata

A kezdetekor PCR-SSCP módszert *Zhou és mtsai* (2007), majd a PCR-RFLP módszert *Shahroudi és mtsai* (2006) nyomán végeztünk el. A PCR reakciókhoz ABI 9700 és MJ Research Thermocycler programozható PCR készülékeket (DNA Thermal Cycler) használtunk.

IGFBP-3 gén polimorfizmus vizsgálata

PCR-RFLP módszert alkalmaztunk a polimorfizmus vizsgálatához, különböző szerzők leírása szerint (*Lan és mtsai*, 2007; *Kumar és mtsai*, 2006)

EREDMÉNYEK

CAST gén polimorfizmus vizsgálata

A vizsgálat első lépéseként PCR-SSCP módszert alkalmaztunk a különböző genotípusok meghatározására. Összesen 6 különböző SSCP mintázatot, genotípust kaptunk a vizsgált egyedekben (1.ábra).

1. ábra A detektált SSCP minták

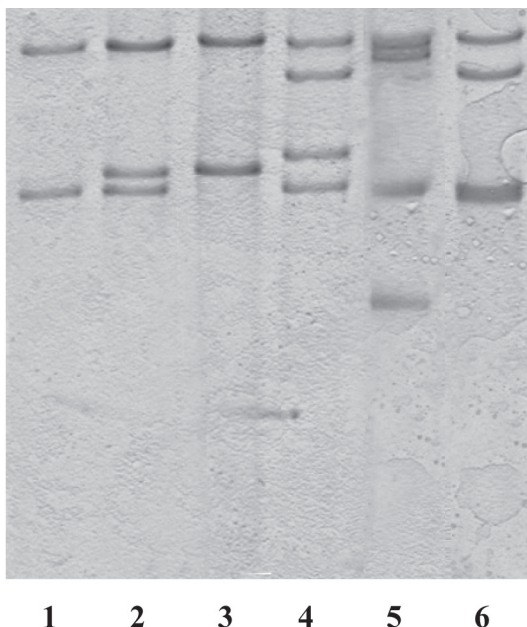
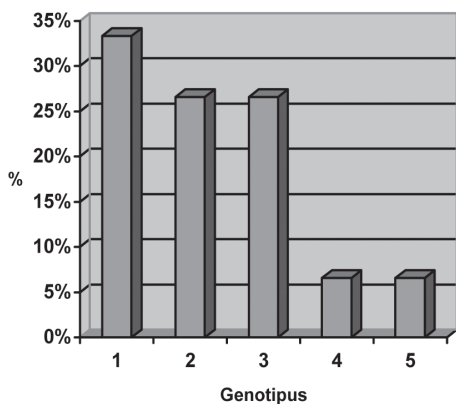


Figure 1. Detected SSCP patterns

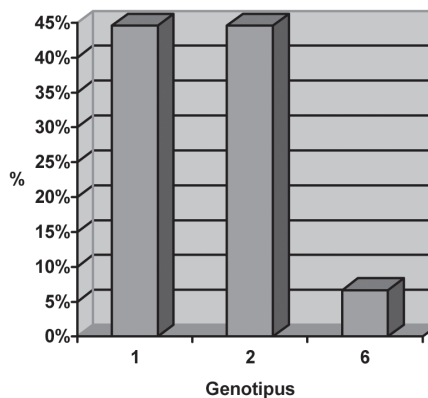
A vizsgált egyedek közül 31 egyed az 1-es csoportba, 33 egyed a 2-es csoportba, 27 egyed a 3-as csoportba, 7 egyed a 4-es csoportba, 1 egyed az 5-ös csoportba, 2 egyed a 6-os csoportba, 2 egyed a 7-es csoportba és 1 egyed a 8-as csoportba tartozik. *Zhou és mtsai* (2007) szerint a 2-es és 3-as SSCP mintázat a CAST 1 allélnak, az 1-es SSCP mintázat a CAST 2 allélnak felel meg. Így elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált gyimesi racka és gyimesi racka keresztezések esetében a CAST 1 és CAST 2 allélok a leggyakoribbak.

A különböző mintázatok megoszlását a különböző juh keresztezésekben a következő ábrák mutatják be (2 a,b,c,d,e,f,g,h,i).

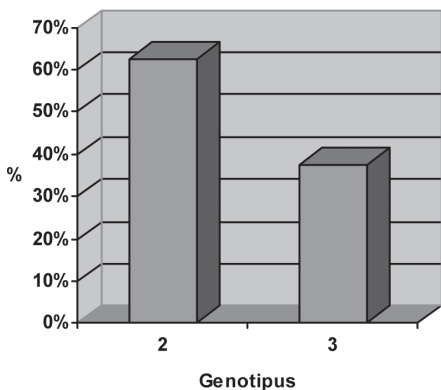
A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka fajtában



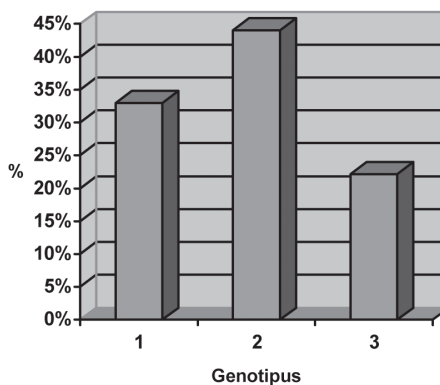
Az genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X brit tejelő keresztezésekben



A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X beltex keresztezésekben

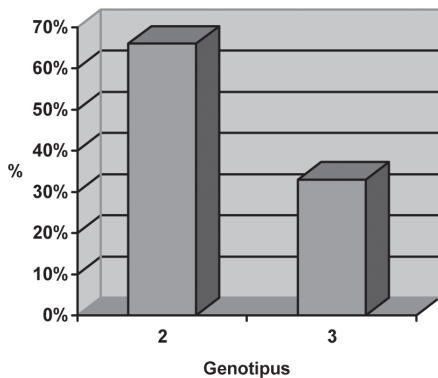


Az genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X charollais keresztezésekben

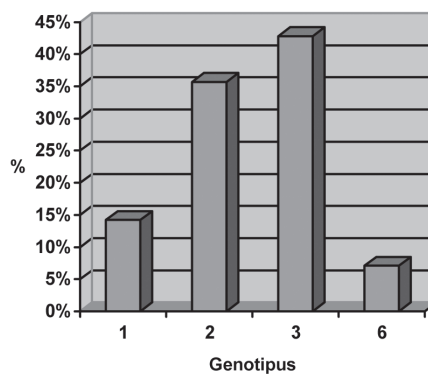


A fajtatiszta gyimesi rackában találtuk a legtöbb genotípust: 1-es, 2-es, 3-as, 4-es és 5-ös. Az 1-es genotípus teszi ki az összes genotípus 33.3%-át. A 2-es és 3-as egyaránt 26.6%-26.6%. A gyimesi racka X beltex keresztezésekben kétféle genotípust találunk: 2-est (62.5%) és 3-ast (37.5%). A gyimesi racka X brit tejelő keresztezésekben található a legtöbb 1-es és 2-es genotípust (7-7-et), melyek egyenlően oszlanak el 46.6%-ban. A harmadik genotípus 6.6%-ban van jelen. A gyimesi racka X charollais keresztezésekben 1-es (33.3%), 2-es (44.4%) és 3-as (22.2%) típusú genotípus található. A gyimesi racka X német feketefejú juh keresztezésekben 3 genotípus oszlik meg: 1-es és 3-as genotípus (egyenként 20%-ban), 2-es genotípus pedig a legnagyobb arányban (60%-ban). A gyimesi racka X dorper keresztezésekben 2-es (66.6%) és 3-as (33.4%) genotípust figyelhetünk meg. A gyimesi racka és ile de france keresztezésekben négy genotípus különül el:

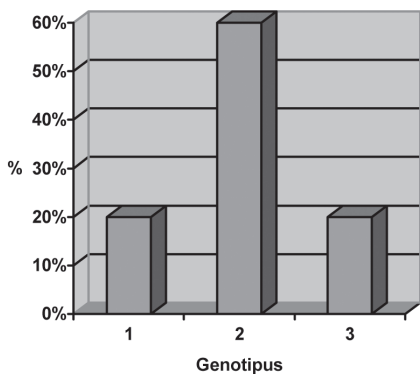
A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X dorper keresztezésekben



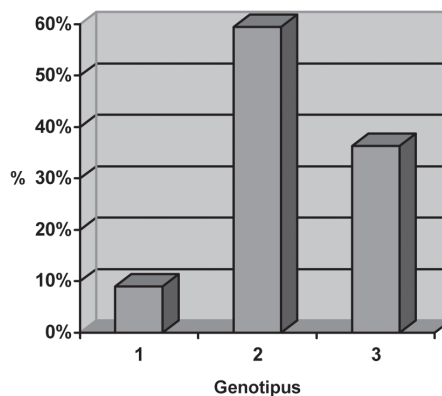
A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X ile de france keresztezésekben



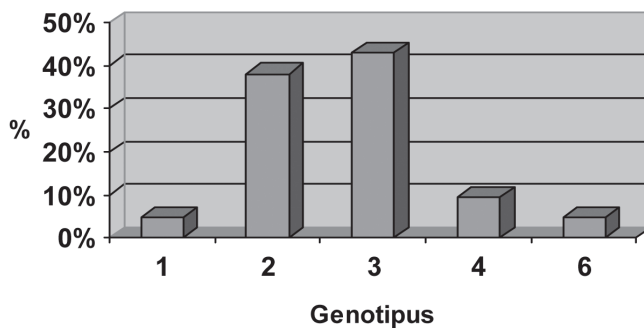
A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X német feketefejű húsjuh keresztezésekben



A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X suffolk keresztezésekben



A genotípusok gyakorisága a gyimesi racka X texel keresztezésekben



1-es (14,2%), 2-es (35,7%), a legnagyobb arányban a 3-as (42,8%) és a legkisebb arányban a 6-os (7,1%) genotípus. A gyimesi racka X suffolk keresztezésekben is az első három genotípus van jelen 9%, 54,5% és 36,3%-ban. A gyimesi racka X texel keresztezésekben öt fajta genotípust figyelhetünk meg, melyből a 2-es és 3-as genotípus szerepel a legnagyobb gyakoriságban (37%-ban és 42,8%-ban).

Az PCR-RFLP vizsgálat során összesen két genotípust kaptunk, az MM-t (101 egyedből 90-nél) az MN-t (101 egyedből 11-nél) (2. táblázat)

2. táblázat

A genotípusok megoszlása keresztezésenként

Keresztezés (1)	Genotípus (2)	
	MM	MN
gyimesi racka (3)	14	1
gyimesi racka X beltex (4)	7	0
gyimesi racka X brit tejelő (5)	12	2
gyimesi racka X charollais (6)	9	0
gyimesi racka X dorper (7)	2	4
gyimesi racka X ile de france (8)	12	2
gyimesi racka X német feketefejű húsjuh (9)	3	2
gyimesi racka X suffolk (10)	11	0
gyimesi racka X texel (11)	20	0

Table 2. Distribution of genotypes
(1) to (11) see Table 1a.

IGFBP-3 gén polimorfizmus vizsgálata

Az IGFBP-3 gén amlifikált termékének hossza 654 bp juhokban. A HaeIII-mal emésztett PCR termékek egy típusú restrikciós mintát mutatnak, 4 különböző fragment mérettel: 201, 87, 67 és 56bp juhokban (AA genotípus) (Kumar és mtsai., 2004).

Mivel minden egyed ugyanolyan genotípusú, ezért nem tudunk sem allél-, sem genotípus gyakoriságot számolni. Nem lehetséges a variancia analízis sem, amivel a vágási tulajdonságok és a genotípusok közötti összefüggést mutatnánk ki. Kumar és mtsai (2006) 152 db indiai juhajtát vizsgálva ugyancsak egy genotípust (AA) kaptak.

KÖVETKEZTETÉSEK

Két hústermelésre ható gén (kalpasztatin és inzulin-szerű növekedési faktor kötő fehérje-3) polimorfizmus vizsgálatát végeztük el fajtatiszta gyimesi racka illetve gyimesi racka és 8 másik juhajtá keresztezésével. Mindkét gén esetében annyira alacsony fokú polimorfizmust találtunk, hogy nem tudtunk összefüggés vizsgálatot elvégezni a genotípus és a hústermelési-vágási tulajdonságok között. Így annak érdekében, hogy a kapott eredmények a jövőben felhasználhatóak legyenek szelekciós markerként további vizsgálatok szükségesek nagyobb egyedszámmal illetve más gének bevonásával.

Köszönetnyilvánítás

A Szerzők ezúton fejezik ki köszönetüket Barta Anikó szakdolgozónak és a Bakonszegi Awassi Zrt. munkatársainak.

IRODALOM

- Ali, B.A. - EL-Hanafy, A.A. - Salem, H.H. (2009): Genetic biodiversity studies on IGFBP-3 gene in egyptian sheep breeds. *Biotechnol. Anim. Husbandry.*, 25. 101-109.
- Bale, L.K. - Conover, C.A. (1992): Regulation of insulin like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 131. 608-614.
- Duan, C. - Xu, Q. (2005): Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 142. 44-52.
- Goll, Darrel E. - Thompson, V.F. - Li, H. - Wei, W. - Cong J. (2002): The Calpain System. *Physiol. Rev.*, 83. 731-801.
- Hastie, P.M. - Onagbesan, O.M. - Haresign, W. (2004): Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGF-II; type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 84. 93-105.
- Hossner, K.L. - McCusker, R.H. - Dodson, M.V. (1997): Insulin-like growth factors and their binding protein in domestic animals. *Anim. Sci.*, 64. 1-15.
- Inazawa J. - Nakagawa H. - Misawa S. - Abe T. - Minoshima S. - Fukuyama R. - Maki M. - Murachi T. - Hatanaka M. - Shimizu N. (1991): Assignment of the human calpastatin gene (CAST) to chromosome 5 at region q14----q22. *Cytogenet. Cell Genet.*, 54. 156-158.
- Kumar, P. - Choudhary, V. - Padma, B. - Mishra, A. - Bhattacharya, T.K. - Bhushan, B. - Sharma, A. (2004): Bubaline insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene polymorphism and its comparison with cattle. *Buffalo J.*, 20. 183-192.
- Kumar, P. - Choudhary, V. - Ganesh Kumar, K. - Bhattacharya, T.K. - Bhushan, B. - Arjava, S. - Mishra, A. (2006): Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo. *Small Rum. Res.*, 64. 285-292.
- Lan, X.Y. - Pan, C.Y. - Chen, H. - Lei, C.Z. - Liu, S.Q. - Zhang, Y.B. - Min, L.J. (2007): The HaeIII and XspI PCR-RFLPs detecting polymorphisms at the goat IGFBP-3 locus. *Small Rum. Res.*, 73. 283-286.
- Shahroudi, F.E. - Nassiry, M.R. - Valizadh, R. - Moussavi, A.H. - Pour, M.T. - Ghiasi, H. (2006): Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian J. Biotechnol.*, 4. 117-122.
- Zhou, H.G. - Hickford, J.G.H. - Gong H. (2007): Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Molec. Cell. Probes*, 21. 242-244
- Zsolnai A. - Orbán L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*, 7. 1462-1468.

Szerzők címe: Jávor A. - Kusza Sz.
Debreceni Egyetem Agrár és Gazdálkodástudományok Centruma,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet

Authors' address: University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
javor@agr.unideb.hu, kusza@agr.unideb.hu

Köszegi S.
Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar,
1.sz.Gyermekegyógyászati Klinika
Semmelweis University, Faculty of Human Medicine
H-1083 Budapest, Bókay J. u. 53.
koszegi.sanyi@gmail.com

Kukovics S.
Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.
sandor.kukovics@atk.hu